

УДК 576.852.22:615.45:615.33

К.В. Типлинська, В.Ю. Горчаков

ВПЛИВ ПОПЕРЕДНЬОГО ЗАМОРОЖУВАННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА НА РІСТ КУЛЬТУР ЛАКТОБАКТЕРІЙ**Вступ**

Вода є унікальною структурою з набором аномальних властивостей, які й досі важко пояснити. Завдяки високому дипольному моменту вона здатна утворювати чотири водневих зв'язки: два — як донор протонів, і два — як акцептор. Саме завдяки цим зв'язкам вода може утворювати молекулярні асоціати, які мають різну структуру і стійкість. Середня тривалість життя молекули в асоціатах становить $1 \cdot 10^{-9}$ с. У стандартних умовах приблизно 30 % усіх молекул води перебуває у вигляді окремих молекул, 40 % входить до складу кластерів (так звана структурована вода), а решта 30 % припадає на випадкові асоціати, які не мають певної структури [1]. Тривалість життя молекул води в кластерах і структурованій воді перевищує $1 \cdot 10^{-9}$ с, причому на тривалість життя істотно впливають температури [2].

Елементарною коміркою кластерів води є структури, що містять зв'язані між собою водневими зв'язками чотири (звичайний тетраедр) або п'ять (об'ємноцентрований тетраедр) молекул води. Молекули води в цих структурах зберігають властивість утворювати водневі зв'язки, завдяки яким вони можуть об'єднуватися вершинами, ребрами або гранями в кластери із складнішою структурою [3]. Структури кластерів води залежно від умов можуть бути схожими на алмаз, графіт, фулерен чи силікат-аніони [3]. У кластерах води може міститись від 50 до 1000 молекул [5]. Тривале життя кластерів забезпечує воді достатньо довготривалу пам'ять — здатність зберігати структурно-інформаційні властивості з часом.

На структурування води, а як наслідок, і на її пам'ять, впливають розчинені речовини. При розчиненні речовин навколо їх частинок (іонів, молекул, міцел) утворюються гідратні оболонки. За тривалістю життя молекул води в гідратній оболонці навколо цих частинок розрізняються додатна і від'ємна гідратації. При додатній гідратації вміст структурованої води збільшується. Більшість компонентів поживних

середовищ (білки, сахариди, в деяких випадках — нуклеїнові кислоти) мають додатну гідратацію [6]. У середині клітин вода перебуває переважно у структурованому стані.

На структурно-інформаційні властивості води значно впливають її фазові переходи. Така вода має підвищену кількість кластерів з льодоподібною структурою. Вони є потужним біологічним стимулятором, оскільки поставляють готові тетраедри для побудови і оновлення гідратних оболонок навколо біосубстратів.

Постановка задачі

Мета статті — визначення впливу попереднього заморожування поживного середовища на ріст і біологічні властивості лактобактерій.

Матеріали і методи експериментальних досліджень

Об'єктами досліджень були штами лактобактерій з музею мікробних культур кафедри промислової біотехнології ФБТ НТУУ «КПІ» (*L. acidophilus* A, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. rhamnosus* DIV-US, *L. rhamnosus* LB3). Культивування молочнокислих бактерій проводилось при 38 °С на рідкому поживному середовищі MRS. Для дослідження впливу заморожування на ріст культур поживне середовище поміщалося на 5 год у морозильну камеру при -26 °С. Розморожувалося воно безпосередньо перед посівом при кімнатній температурі. До кожної пробірки додавалось по 0,4 мл суспензії культур стандарту мутності 0,5 мкФ. Далі культури інкубувались протягом 24 год з визначенням динаміки росту культур виміром рН поживного середовища та концентрації абсолютної сухої біомаси.

Для визначення концентрації біомаси культури після росту центрифугувались, зливалось поживне середовище і розводилось дистильованою водою. Кількісно переносились в бюкси та сушилися при 105 °С до постійної маси.

Усі дослідження проводились в чотирьох паралелях. Кожна точка графіків відповідала середньому значенню M . Також обраховувалося стандартне відхилення m . Достовірність різниці в рості культур визначалась за критерієм Стюдента. Обчислення результатів і побудова графічних залежностей виконувались з використанням програми Microsoft Excel [8, 9].

Результати і обговорення

Рис. 1. *L. acidophilus* A. Для культури спостерігається стимуляція росту культури в середовищі після заморожування (рис. 1). Оскільки значення t на 24-у годину росту менше 3,18 (табл. 1), то різниця в накопиченні біомаси

між двома типами середовищ не достовірна. В той же час, рН контрольного середовища достовірно нижчий, ніж у досліджуваного. Це може свідчити про зниження кислотоутворювальної функції штаму.

Рис. 2. *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788. Для культури різниця в нако-

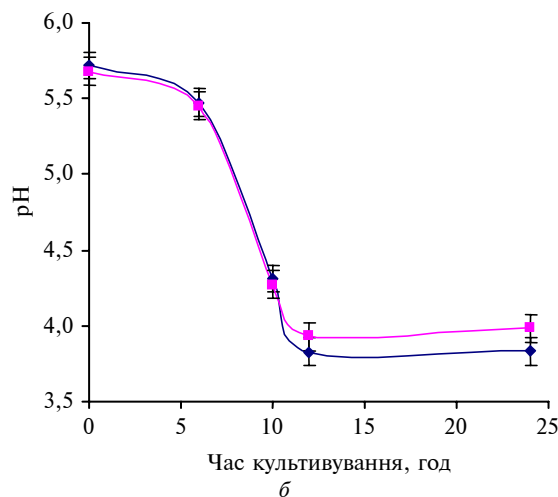
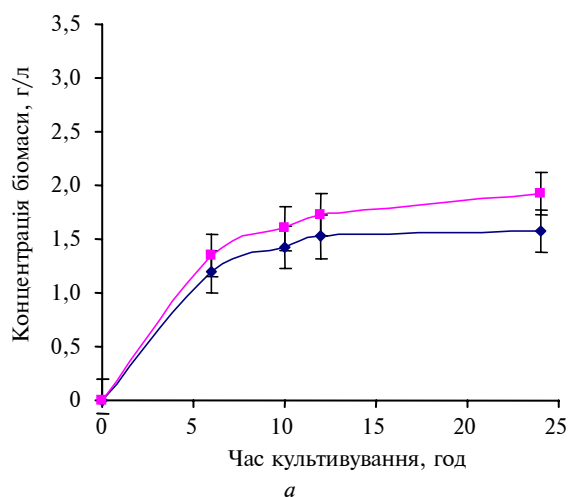


Рис. 1. Динаміка росту культури *L. acidophilus* A: а – зміна концентрації біомаси; б – зміна рН; ◆ – контроль; ■ – після заморожування

Таблиця 1. Зміна значення рН середовища і концентрації біомаси в процесі росту культури *L. acidophilus* A

Години	рН			Концентрація біомаси, г/л		
	Контроль	Середовище після заморожування	t	Контроль	Середовище після заморожування	t
0	$5,70 \pm 0$	$5,72 \pm 0$	—	0,00	0,00	—
6	$5,53 \pm 0,02$	$5,50 \pm 0,04$	1,34	$1,2 \pm 0,2$	$1,35 \pm 0,1$	1,34
10	$5,43 \pm 0,06$	$5,09 \pm 0,05$	8,51	$1,43 \pm 0,1$	$1,60 \pm 0,2$	1,57
12	$5,17 \pm 1,05$	$4,34 \pm 0,04$	25,85	$1,53 \pm 0,1$	$1,73 \pm 0,3$	1,26
24	$4,84 \pm 0,06$	$4,04 \pm 0,03$	23,93	$1,58 \pm 0,2$	$1,93 \pm 0,2$	2,47

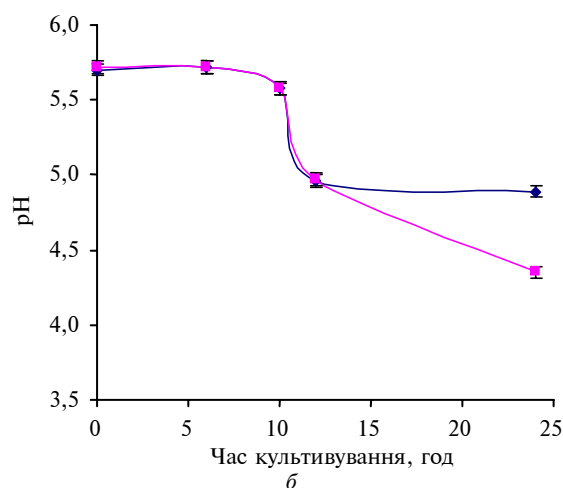
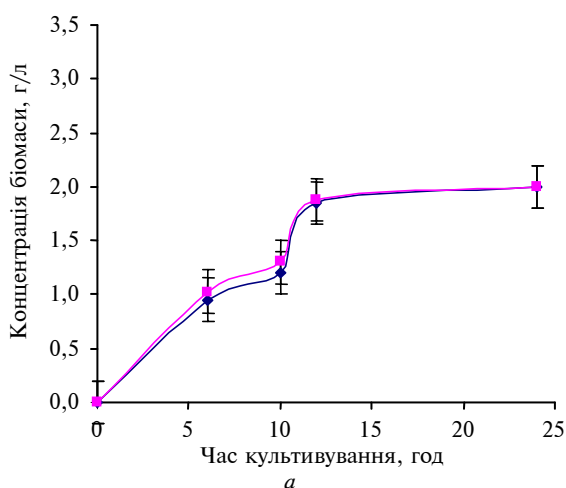


Рис. 2. Динаміка росту культури *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788: а – зміна концентрації біомаси; б – зміна рН; ◆ – контроль; ■ – після заморожування

пиченні біомаси не спостерігається (рис. 2, а), про що свідчать невисокі значення t (табл. 2). В той же час, значення рН наприкінці культивування істотно відрізняються від початкових (рис. 2, б). Значення рН у контрольному середовищі після 12 год майже не змінюється, тоді як спостерігається активне зниження рН при рості культур у середовищі після заморожування.

Рис. *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074. Для культури на 24-у годину росту спостерігалась стимуляція росту біомаси (рис. 3, а), про

достовірність різниці свідчить значення t (табл. 3). Щодо рН, то після 10-ї години в середовищі після заморожування воно спадає різкіше і на 24-у годину значно відрізняється від контрольного (рис. 3, б).

Рис. *L. rhamnosus* DIV-US. Для культури після 10-ї години росту спостерігалась значна стимуляція росту культури (рис. 4, а), про що свідчать і значення t (табл. 4). Значення рН контрольного середовища нижче, ніж у досліджуваному середовищі (див. рис. 3, б). Це свідчить, що ріст культури в середовищі після за-

Таблиця 2. Зміна значення рН середовища і концентрації біомаси в процесі росту культури *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788

Години	рН			Концентрація біомаси, г/л		
	Контроль	Середовище після заморожування	t	Контроль	Середовище після заморожування	t
0	$5,70 \pm 0,00$	$5,72 \pm 0,00$	—	0,00	0,00	—
6	$5,72 \pm 0,00$	$5,72 \pm 0,00$	—	$0,95 \pm 0,1$	$1,03 \pm 0,1$	1,06
10	$5,58 \pm 0,02$	$5,58 \pm 0,03$	0,28	$1,20 \pm 0,2$	$1,30 \pm 0,2$	0,71
12	$4,96 \pm 0,01$	$4,97 \pm 0,02$	0,67	$1,85 \pm 0,1$	$1,88 \pm 0,1$	0,35
24	$4,89 \pm 0,04$	$4,35 \pm 0,04$	19,09	$2,00 \pm 0,2$	$2,00 \pm 0$	0

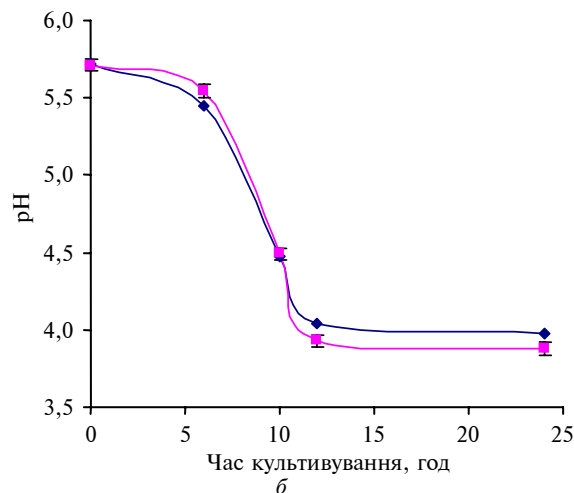
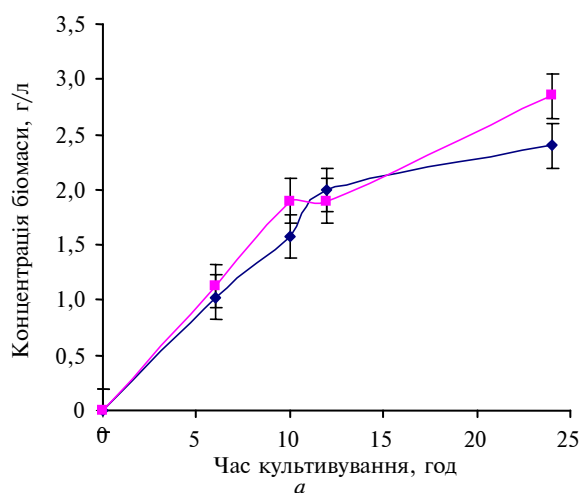


Рис. 3. Динаміка росту культури *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074: а — зміна концентрації біомаси; б — зміна рН; —♦— — контроль; —■— — після заморожування

Таблиця 3. Зміна значення рН середовища і концентрації біомаси в процесі росту культури *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074

Години	рН			Концентрація біомаси, г/л		
	Контроль	Середовище після заморожування	t	Контроль	Середовище після заморожування	t
0	$5,72 \pm 0,00$	$5,71 \pm 0,00$	—	0,0	0,0	—
6	$5,45 \pm 0,02$	$5,55 \pm 0,01$	8,72	$1,03 \pm 0,1$	$1,12 \pm 0,1$	1,41
10	$4,48 \pm 0,03$	$4,49 \pm 0,04$	0,70	$1,58 \pm 0,1$	$1,90 \pm 0,2$	2,91
12	$4,04 \pm 0,05$	$3,93 \pm 0,02$	3,99	$2,00 \pm 0,2$	$1,90 \pm 0,0$	1,00
24	$3,98 \pm 0,02$	$3,88 \pm 0,02$	7,07	$2,40 \pm 0,2$	$2,85 \pm 0,1$	4,02

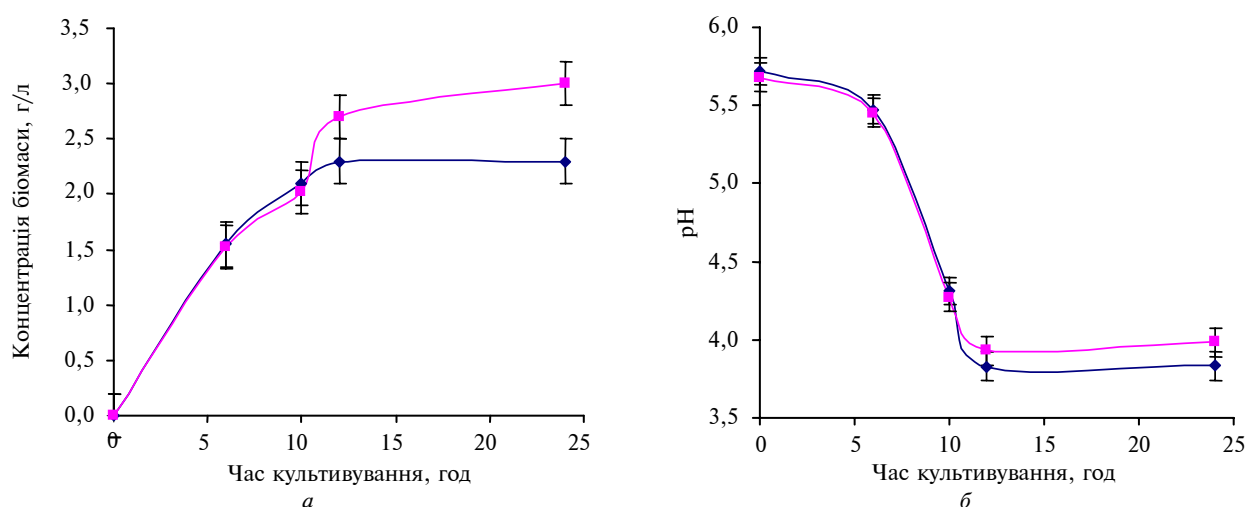


Рис. 4. Динаміка росту культури *L. rhamnosus* DIV-US: *a* – зміна концентрації біомаси; *б* – зміна pH; ◆ – контроль; ■ – після заморозування

Таблиця 4. Зміна pH середовища і концентрації біомаси в процесі росту культури *L. rhamnosus* DIV-US

Години	pH			Концентрація біомаси, г/л		
	Контроль	Середовище після заморозування	<i>t</i>	Контроль	Середовище після заморозування	<i>t</i>
0	5,72 ± 0,00	5,68 ± 0,00	—	0,0	0,0	—
6	5,47 ± 0,03	5,45 ± 0,04	0,80	1,55 ± 0,1	1,53 ± 0,2	0,22
10	4,31 ± 0,02	4,27 ± 0,05	1,39	2,10 ± 0,2	2,03 ± 0,1	0,67
12	3,83 ± 0,06	3,93 ± 0,06	2,30	2,30 ± 0,2	2,70 ± 0,2	2,83
24	3,83 ± 0,03	3,99 ± 0,09	3,21	2,30 ± 0,0	3,00 ± 0,2	7,00

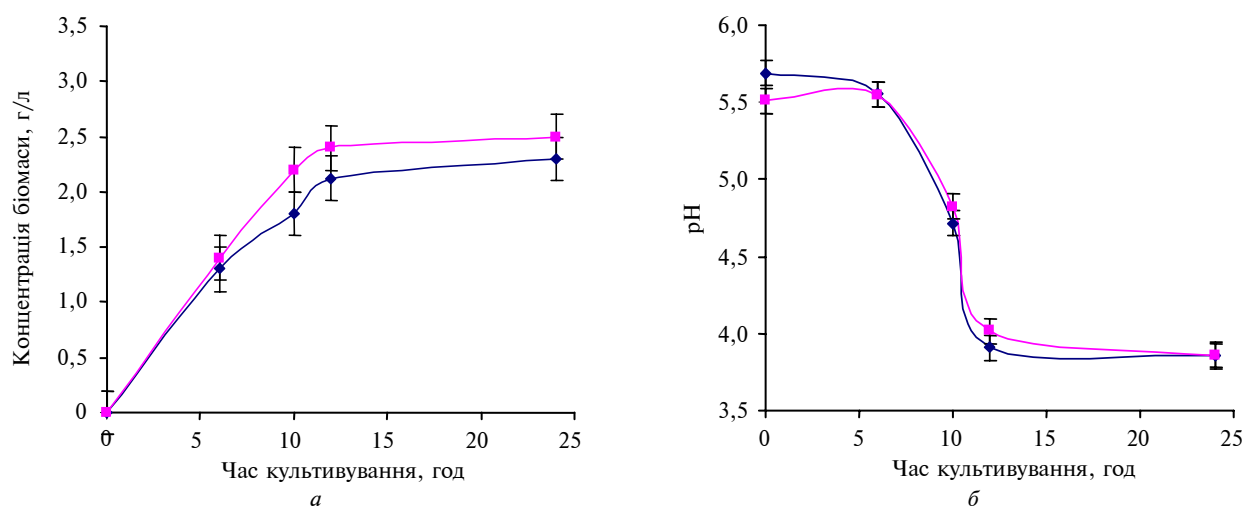


Рис. 5. Динаміка росту культури *L. rhamnosus* LB3: *a* – зміна концентрації біомаси; *б* – зміна pH; ◆ – контроль; ■ – після заморозування

морозування не призводить до значного кислотоутворення.

Різм *L. rhamnosus* LB3. Для культури після 10-ї години росту спостерігалась стимуля-

ція росту культури (рис. 5, *a*), про що свідчать і значення *t* (табл. 5). Значення pH середовища для обох середовищ однакове (рис. 5, *б*).

Таблиця 5. Зміна значення рН середовища і концентрації біомаси в процесі росту культури *L. rhamnosus* LB3

Години	рН			Концентрація біомаси, г/л		
	Контроль	Середовище після заморожування	<i>t</i>	Контроль	Середовище після заморожування	<i>t</i>
0	5,69 ± 0,00	5,51 ± 0,00	—	0,0	0,0	—
6	5,55 ± 0,03	5,55 ± 0,02	0,14	1,30 ± 0,2	1,40 ± 0,0	1,00
10	4,72 ± 0,03	4,83 ± 0,08	2,52	1,80 ± 0,2	2,20 ± 0,2	2,83
12	3,91 ± 0,02	4,02 ± 0,02	7,60	2,13 ± 0,2	2,40 ± 0,2	1,94
24	3,86 ± 0,05	3,86 ± 0,02	0,28	2,28 ± 0,1	2,50 ± 0,0	4,50

Висновки

Встановлено, що попереднє заморожування поживного середовища впливає на ріст і кислотоутворення лактобактерій.

Попереднє заморожування поживного середовища сильніше впливає на рН (в бік підвищення), що поряд з посиленням росту біомаси може вказувати на пригнічення синтезу молочної кислоти.

Найсильнішу дію попереднє заморожування середовища мало на штами *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. rhamnosus* DIV-US та *L. rhamnosus* LB3.

У подальшому предметом дослідження впливу попереднього заморожування можуть стати штами продуценти пробіотичних препаратів.

Е.В. Типлинская, В.Ю. Горчаков

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА РОСТ КУЛЬТУР ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Показано, что предварительное замораживание питательной среды может стимулировать рост молочнокислых бактерий, причем повышение концентрации клеток не всегда ведет к снижению рН. Наибольшее влияние замораживание на быстрорастущие штаммы.

K.V. Typlynska, V.Yu. Gorchakov

THE EFFECT OF PRE-FREEZING OF NUTRIENT MEDIA ON THE GROWTH OF LAKTOBACTERIA

We show that pre-freezing nutrient media can stimulate the growth of lactic bacteria. In addition, increasing the cells concentration does not always lead to pH lowering. We uncover that freezing has the greatest impact on the fast growing strains.

1. Синюков В.В. Вода известная и неизвестная. — М.: Знание, 1987. — 284 с.
2. Слесарев В.И. Химия: основы химии живого. — СПб.: Химиздат, 2000. — 784 с.
3. Зацепина Г.Н. Физические свойства и структура воды. — М.: Изд-во МГУ, 1998. — 184 с.
4. Антонченко В.Я., Давыдов А.С., Ильин В.В. Основы физики воды. — К.: Наук. думка, 1991. — 635 с.
5. Зенин С.В. Структурированное состояние воды как основа управления поведением и безопасностью живых систем: Автореф.: дис. ... докт. мед. наук. — М., 1999. — 42 с.
6. Самойлов О.Я. Структура водных растворов и гидратация ионов. — М., 1957.
7. Онацкая А.А., Музалевская Н.И. Химия — традиционная и парадоксальная. — Л.: Изд-во ЛГУ, 1985. — С. 88—113.
8. Макарова Н.В., Трофимец В.Я. Статистика в Excel: Учеб. пос. — М.: Финансы и статистика, 2006. — 368 с.
9. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистика в науке и бизнесе. — К.: МОРИОН, 2002. — 640 с.